

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/DE05/000550

International filing date: 29 March 2005 (29.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 10 2004 015 143.1
Filing date: 27 March 2004 (27.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 10 June 2005 (10.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 10 2004 015 143.1

Anmeldetag: 27. März 2004


Anmelder/Inhaber: Dr. Hanns-Georg Klein, 82152 Martinsried/DE

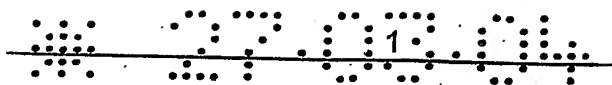
Bezeichnung: Polymorphismen im NOD2/CARD15 Gen

IPC: C 07 H, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 1. Juni 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag


Stremme



3

Polymorphismen im NOD2/CARD15 Gen

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren sowie in diesen Verfahren verwendete Nucleotidsequenzen zur Vorhersage und/oder Diagnose von Krankheiten, welche mit mindestens einem der Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13 im NOD2/CARD15 Gen in Verbindung stehen.

10

Die Einzelnucleotidpolymorphismen (SNP: single nucleotide polymorphism) 8, 12, 13 im NOD2/CARD15 Gen werden für das Auftreten der Crohnschen Krankheit verantwortlich gemacht (Hugot JP, Chamäillard M, Zouali H, Nature 2001, 411, 599-603; Ogura Y, Bonen DK, Inohara N Nature 2001, 411, 603-606). Bei der Crohnschen Krankheit handelt es sich um eine zwar seltene, aber verheerende chronisch wiederkehrende Entzündung des Verdauungstraktes, die vor allem Dün- und Dickdarm befällt. Dabei kommt es zu einer Verdickung der Darmwand und zu Geschwürbildungen.

20

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es nun, Verfahren zur Vorhersage und Diagnose von Krankheiten bereitzustellen, welche durch die Mutationen/Varianten Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13 im NOD2/CARD15 Gen ausgelöst oder initiiert werden.

25

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung von Verfahren gemäß Anspruch 1 gelöst. Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen, Aspekte und Details der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen, der Beschreibung, den Beispielen und den Figuren.

30

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Vorhersage und/oder Diagnose von mit mindestens einem der Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13 im NOD2/CARD15 Gen assoziierten Krankheiten durch Nachweis mindestens eines der Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13 im NOD2/CARD15 Gen.

35

Anders ausgedrückt betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zum Nachweis mindestens eines der Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13 im NOD2/CARD15 Gen zur Vorhersage und/oder Diagnose von mit diesem Gendefekt bzw. einer Mutation bzw. einer Genvarianten assoziierten Krankheiten.

5

Das NOD2/CARD15 Gen hat folgende Gene Bank Accession Number: AC007728 und AQ534686. Die Nucleotidsequenz ist unter den angegebenen Accession Nummern aus der NCBI-Datenbank unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> erhältlich.

10

Das NOD2-Gen ist 3123 Nukleotide lang (1040 Aminosäuren, Gene Bank Accession number NM_022162), (NOD: Nucleotide Oligomerisation Domain) und befindet sich in der perizentromerischen Region des Chromosoms 16 (16p12-q21). Die Nomenklatur des Gens NOD2 wurde inzwischen geändert zu CARD15 (CARD: Caspase Activating Recruitment Domain). Caspasen spielen eine wichtige Rolle bei der Apoptose. Neben der CARD Domäne besitzt NOD2/CARD15 eine ATB Bindungsdomäne. NOD2/CARD15 dient als intrazellulärer Rezeptor für bakterielle Produkte und transduziert das Signal zur Aktivierung von NFkappaB (NF-κB).

15

20

In dem NOD2/CARD15 Gen können unter anderem Einzelnucleotid-polymorphismen (SNPs) Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13 auftreten. SNPs entstehen durch einen Basenaustausch oder Insertion einer zusätzlichen Base in die DNA-Sequenz.

25

SNP8 (SNP Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>, Accession Number ss2978536) bezeichnet einen Polymorphismus im NOD2/CARD15 Gen, der durch den Austausch des Nucleotids Position 2209 (NM_022162) C → T entsteht. Resultierend findet im Protein der Austausch von R702W statt. SNP8 befindet sich im Chromosom 16 an der Chromosomenposition 50523959 (NOD2/CARD15 Gen - Exon 5). Hugot JP et al., Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001, 411, 599-603.

30

35

SNP12 (SNP Datenbank, Accession Number ss2978537) bezeichnet einen Polymorphismus im NOD2/CARD15 Gen, der durch den Austausch des Nucleotids Position 2827 (NM_022162) G → C entsteht. Resultierend findet im Protein der Austausch von G908R statt. SNP12 befindet sich im Chromosom 16 an der Chromosomenposition 50534573 (NOD2/CARD15 Gen- Exon 9). Hugot

JP et al., Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001, 411, 599-603

5. SNP13 (SNP Datenbank, Accession Number ss2978539) bezeichnet einen Polymorphismus im NOD2/CARD15 Gen, der durch 1 Base Insertion des Nucleotids C am Nucleotid Position 3124 (NM_022162). SNP13 befindet sich im Chromosom 16 an der Chromosomenposition 50541811^50541812. Durch die Insertion resultiert ein Frameshift, der ein verkürztes NOD2 mit 1007 Aminosäuren bedingt (Ogura et al., Nature 2001, 411, 603-606).

10

Durch die oben genannten Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13 entstehen folgende 7 Mutanten / Varianten, nämlich

15

- Mutante 1: Mutation durch SNP8,
- Mutante 2: Mutation durch SNP12,
- Mutante 3: Insertion durch SNP13,
- Mutante 4: Mutationen durch SNP8 und 12,
- Mutante 5: Mutation und Insertion durch SNP8 und 13,
- Mutante 6: Mutation und Insertion durch SNP12 und 13,
- Mutante 7: Mutationen und Insertion durch SN 8, 12 und 13.

20

Überraschenderweise konnte nachgewiesen werden, dass bereits eine der vorgenannten Mutationen ausreicht um diverse Krankheiten auszulösen. Die vorgenannten Mutationen stehen beispielsweise mit der Crohnschen Krankheit, Abstoßungsreaktionen in der Transplantationsmedizin, Graft-versus-host-Erkrankungen, Lungenerkrankungen, Monozyten- und/oder Makrophagen-abhängige Erkrankungen, Leukämie (z.B. akute myeloische Leukämie, chronische myeloische Leukämie, akute lymphatische Leukämie) in Verbindung.

25

30. Unter Monozyten-abhängige Erkrankungen sind unter anderem Krankheiten zu verstehen, welche durch eine Fehlfunktion von Monozyten ausgelöst werden. Demnach umfassen Makrophagen-abhängige Erkrankungen Krankheiten, welche durch eine Makrophagenfehlfunktion ausgelöst werden.

35. Als Lungenerkrankungen kommen beispielsweise chronische Bronchitis in Frage.

Zu den Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen zählen insbesondere immunologische Reaktionen des Empfängers gegen das Spenderorgan als auch

Transplantat gegen Wirt Reaktionen (GvHD: Graft versus Host Disease). Derartige Folgen treten relativ spät nach einer Transplantation auf und können zu lebensbedrohlichen Komplikation führen.

5 Beispiele für Transplantationen sind insbesondere Rückenmark-, Knochenmark- und Stammzelltransplantationen sowie Transplantationen solider Organe wie beispielsweise Herz, Lunge, Leber, Niere, Bauchspeicheldrüse, Haut, hormonproduzierende Drüsen sowie Keimdrüsen.

10 Ferner wurde überraschend gefunden, dass bereits eine der vorgenannten Mutationen ausreicht um diverse Krankheiten auszulösen, welche mit einer Störung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges in Verbindung stehen. Eine Störung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges kann sowohl eine Inhibierung als auch eine Aktivierung bedeuten. Die in Verbindung mit einer Störung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges stehenden Krankheiten werden somit durch eine Aktivierung oder Inhibierung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges initiiert, ausgelöst, verschlimmert und/oder hervorgerufen.

20 Insbesondere vorteilhaft ist die Anwendung der erfindungsgemäßen Verfahren für die Prätransplantationsdiagnostik. Die erfindungsgemäßen Verfahren ermöglichen die Vorhersage von Abstoßungsreaktionen des Empfängers gegenüber dem Spenderorgan sowie Transplantat gegen Wirt Reaktionen (GvHD) und dienen somit dazu, für einen bestimmten Empfänger ein geeignetes Spenderorgan auszuwählen. Insbesondere treten dann Abstoßungsreaktionen auf, wenn sowohl der Empfänger als auch der Spender eine der oben beschriebenen Mutationen 1 – 7 aufweisen, wie weiter unter noch ausführlich ausgeführt wird.

30 Die erfindungsgemäßen Verfahren umfassen das Bereitstellen einer Probe, welche das Gen NOD2/CARD15 enthält und die anschließende Analyse des Gens NOD2/CARD15 auf das Vorliegen mindestens einer der oben beschriebenen Mutationen 1 – 7. Vorzugsweise wird für die Untersuchung genomische DNA oder cDNA oder RNA verwendet.

35 Als Probe können Blut, Speichel / Mundschleimhautzellen, Knochenmark, Urinsediment, Punktatflüssigkeit, Zell- sowie Gewebeproben verwendet werden, wobei Blutproben bevorzugt sind.

Bezüglich der Prätransplantationsdiagnostik ist es zudem bevorzugt, eine Probe des Empfängers sowie separat davon auch eine Probe des Spenders zu untersuchen.

- 5 Nach dem Bereitstellen einer Probe, welche das Gen NOD2/CARD15 enthält, erfolgt die Untersuchung des Gens bezüglich des Vorliegens mindestens einer der oben genannten Mutationen 1 – 7 bzw. mindestens eines der Polymorphismen 8, 12, 13.

- 10 Diese Untersuchung dann durch verschiedene Methoden erfolgen, welche bevorzugt die Isolation der DNA aus der Probe mit nachfolgender Durchführung einer PCR (Polymerase Chain Reaction) mit für das Gen NOD2/CARD15 spezifischen Primern umfassen.

- 15 Als Primer können beispielsweise die in THE LANCET 2002, 359, 1661-1665 beschriebenen eingesetzt werden.

Die durch PCR erhaltenen Nucleotide können dann unter Verwendung diverser Methoden auf das Vorliegen der Mutationen untersucht werden. Zu diesen

- 20 Methoden zählen beispielsweise: Primerextensionsverfahren, mutationsspezifische Hybridisierung, ARMS-Technologien, Array-Technologien, Chip-Technologien, DNA-Sequenzanalyse, Restriktionsanalyse (RFLP), Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (SSCP), denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese, Gelelektrophorese mit Temperaturgradient, denaturierende HPLC, elektrochemische Nachweisverfahren. Insbesondere bevorzugt ist die Messung von Hybridisierungssignalen von markierten Hybridisierungssequenzen.

Kurz Beschreibung der Methoden

- 30 Ein Verfahren zum Nachweis bekannter SNPs oder Mutationen, welches in der Routinediagnostik zum Einsatz kommt, ist die allelspezifische Hybridisierung von fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden (allelspezifische Oligonucleotidhybridisierung oder **ASO**). Bei dieser Technik wird der PCR eine Wildtyp- und eine mutationsspezifische Sonde zugesetzt, deren Fluoreszenz erst sichtbar wird,
- 35 nachdem die zuvor spezifisch gebundene Sonde durch die DNA-Polymerase im Zuge der Strangelongation abgebaut wurde (sog. Exonuklease-Assay). Je nachdem, ob Wildtyp oder SNP/Mutation vorliegt, erhält man unterschiedliche

Farbsignale, welche nach Anregung durch Laserlicht in einer Photozelle detektiert werden. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der Teilautomatisierbarkeit, wodurch größere Probenzahlen schneller bearbeitet werden können.

- 5 Ein neueres, in Schweden entwickeltes Verfahren zum Nachweis bekannter Mutationen oder SNPs ist das **Pyrosequencing**. Ähnlich der klassischen DNA-Sequenzanalyse mit dem Sanger-Verfahren (s.u.) kann mittels Pyrosequencing die DNA-Sequenz direkt analysiert werden. Allerdings beruht die Reaktion nicht auf der Detektion von Fluoreszenzsignalen von eingebauten Stop-Nukleotiden, sondern auf einer messbaren Freisetzung von Licht, wenn das jeweils passende Nukleotid bei der Strangelongation in die DNA eingebaut wird. Insbesondere werden zum Nachweis des Vorliegens einer Mutation Hybridisierungssequenzen, d.h. Oligonucleotide mit komplementären Sequenzen eingesetzt, welche vorzugsweise Detektionsmarker tragen.

15

- Eine weitere Methode zur Analyse bekannter Polymorphismen oder SNPs ist der Nachweis über sequenzspezifische Sonden mittels **LightCycler**. Dabei wird zu einem DNA-Templat ein spezieller Reaktionsmix gegeben, der u.a. Primer und spezifische Sonden enthält. Für die Detektion eines SNP wird jeweils ein Sondenpaar benötigt, das aus einer Anker- und einer Sensor-Sonde besteht. Beide Sonden binden in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander an die zu analysierende Sequenz. Nach Exzitation des Fluoresceinmoleküls an der Ankersonde kommt es zum Energietransfer auf das LC-Red-Molekül an der Sensorsonde (Fluoreszenz-Resonanz-Transfer, FRET-Assay). Das von der Sensorsonde emittierte Licht wird gemessen und steht dafür, dass die Sonden korrekt an die Zielsequenz gebunden sind. Die Ermittlung des Genotyps erfolgt über eine Schmelzkurvenanalyse.

20

25

- 30 Ein Verfahren, welches sich besonders zum simultanen Nachweis mehrerer bekannter Mutationen (sog. Multiplexanalyse) eignet, ist der **Oligonukleotid-Ligation-Assay (OLA)**. Der OLA kommt vorwiegend in Stufe II (Analyse auf die 31 häufigsten Mutationen) der CFTR-Diagnostik zum Einsatz. In einer Multiplex-PCR-Reaktion werden 15 Zielregionen des CFTR-Gens amplifiziert. Die PCR-Produkte aus der Multiplex-PCR dienen als Ausgangsmoleküle für eine Ligationsreaktion, die durch Zugabe eines OLA-Reagenzes gestartet wird. Das OLA-Reagenz enthält Oligonukleotide, welche teilweise fluoreszenzmarkiert sind sowie eine DNA-Ligase. Bei der Reaktion werden 3 Sondentypen eingesetzt: a) eine

35

gemeinsame ("common") Sonde, die am 3'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (blau, grün oder gelb) markiert ist, b) 29 wildtypspezifische Sonden und c) 31 mutationsspezifische Sonden. Die gemeinsame Sonde bindet an die Zielsequenz unabhängig davon, ob eine Wildtyp- oder mutante Sequenz vorliegt. Die Wildtyp- und Mutationssonden unterscheiden sich nur durch ein Nukleotid am 3'-Ende. Am 5'-Ende von Wildtyp- und Mutationssonde hängt jeweils ein sog. PEO-Molekül, dessen Länge spezifisch für jede nachzuweisende Zielsequenz ist. Die Wildtyp- und Mutationssonden konkurrieren um die Bindungsstelle an die Zielsequenz, wobei nur die Sonde bindet, die exakt mit der Zielsequenz komplementär ist. Liegt keine der 31 zu analysierenden Mutationen vor, binden nur die Wildtypsonden. Ist eine Mutation homozygot vorhanden, bindet nur die Mutationssonde. Bei Heterozygotie binden sowohl Wildtyp- wie auch Mutationssonde an die Zielsequenz. Die DNA-Ligase verknüpft die gemeinsame und Wildtyp- oder Mutationssonde nach Hybridisierung an die Zielsequenz. Jedes Ligationsprodukt kann nun über seine spezifische Länge und die unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung der gemeinsamen Sonde kapillarelektrophoretisch nachgewiesen werden.

Somit bezieht sich die vorliegende Erfindung auch auf Oligonucleotide, welche aus mindestens 10 Nucleotidbausteinen bestehen, eine zur Mutation SNP8 und/oder SNP12 und/oder SNP13 komplementäre Sequenz aufweisen und zur Hybridisierung mit dem Bereich des Gens NOD2/CARD15 befähigt sind, der den Polymorphismus Nod2-SNP8 und/oder Nod2-SNP12 und/oder Nod2-SNP13 enthält.

Beziehungswise betrifft die vorliegende Erfindung Oligonucleotide bestehend aus mindestens 10 Nucleotiden, wobei die Oligonucleotide eine zum NOD2/CARD15 Gen komplementäre Sequenz haben und die komplementären Nucleotide zur Mutation SNP8 und/oder SNP12 und/oder die Nucleotidinsertion SNP13 enthalten.

Derartige Oligonucleotide tragen bevorzugt Detektionsmarker zur spektroskopischen Analyse bzw. zur Fluoreszenz- oder Chemilumineszenzbasierten Analyse. Ferner bestehen die Oligonucleotide bevorzugt aus 15 – 50 Nucleotidbausteinen und insbesondere bevorzugt aus 18 – 22 Nucleotidbausteinen.

- 5 Anstelle des Einsatzes von DNA-Proben können auch RNA-Proben zum Nachweis der Polymorphismen eingesetzt werden. Die RNA-basierten Verfahren benötigen jedoch Proben von Zellen, welche auch das NOD2/CARD15 Gen exprimieren.

Figurenbeschreibung

- 10 Figur 1 zeigt die kumulative Inzidenz von schwerer akuten GvHD (Grad III/OV) in Bezug zu NOD2/CARD15 SNPs: R= Empfänger, D= Spender; R&D wt = nicht-mutantes Wildtyp SNPs in R und D (n=119); R mut, D mut = mutante SNPs nur in Empfänger (n = 22); R wt, D mut = mutantes SNPs nur in Spendern (n=16), R & D mut = mutantes SNPs in Spender und Empfänger (n=12). Die Unterschiede waren hoch signifikant: p 0,001 für die ganzen Gruppen; p 0,02 für R mut D wt; p 0,004 für R wt/Dmut und p 0,001 für R & D mut wenn es mit nicht mutantern R & D verglichen wurde.
- 15
- 20 Figur 2+3: zeigt die kumulative Inzidenz von 1 Jahr TRM in Bezug auf NOD2/CARD15 SNPs: wt = nicht-mutante SNPs sowohl in Empfängern als auch in Spendern; mut = irgendein mutiertes SNP in Spendern oder Empfängern oder in beiden.
- 25 Figur 2 zeigt die HLA-identischen Schwester-Transplantate; wt: n=55, mut n=23
- Figur 3 zeigt HLA nicht verwandte Spender-Transplantate; wt: n= 61, mut; n = 25
- 30

Beispiele

Methoden

- 5 169 aufeinander folgende Patienten, die für die allogenen Stammzelltransplantation aufgenommen wurden, wurden in die Studie einbezogen. Konditionierung und prophylaktische Immunsuppression wurde nach Standardprotokollen durchgeführt. Konditionierung mit reduzierter Intensität (RIC) bestand aus Fludarabine, BCNU und Melphalan. 78 Patienten erhielten
- 10 Transplantate von HLA-identischen Geschwistern (MRD, matched related donors), 87 Patienten ohne Beziehung zu Spendern (URD, unrelated donors) und in 4 Patienten diente ein Verwandter, der sich in einem HLA-Antigen unterschied (RD) als Spender. In der nicht-verwandten Spendergruppe passten Spender/Empfänger Paare für HLA A, B, DRB1 und DQB1 wie durch
- 15 Niedrigauflösung durchgeführte Typisierung für Klasse I und durch Hochauflösung durchgeführte Typisierung für Klasse II festgelegt wurden. Wohingegen in den verbleibenden 23 Paaren eine oder zwei Allelabweichungen für DRB1 und DQB1 akzeptiert wurden. Der Grad der GvHD wurde gemäß den
- 20 Glucksberg-Kriterien (Glucksberg H et al. Transplantation 1974, 18, 295-304) bestimmt. Die Hauptvariablen wie Transplantat bezogene Mortalität (TRM= Tod in Remission) und die Todesursachen wurden in eine monatliche aktualisierte Datenbank aufgenommen. Mediane Beobachtungszeit für überlebende Patienten oder nach einem Rezidiv sterbende Patienten war 450 Tage (Bereich 30-1767 Tage), mediane Beobachtungszeit für an TRM sterbende Patienten war
- 25 172 Tage (Bereich 14-1065 Tage).

Kollektion von DNA-Proben

- 30 DNA aus 169 Patienten (Empfänger) und von 168 Spendern wurde zum Zeitpunkt der Stammzelltransplantation aus Blutproben nach Standardmethoden präpariert, eingefroren und retrospektiv analysiert, um die Rolle von NOD2/CARD15 Mutationen zu beurteilen.
- 35 Allellische Diskriminierung des NOD2/CARD15 Gens:

Einzelnukleotid Polymorphismen NOD2-SNP8, NOD2-SNP12 und NOD2-SNP13 wurden durch ein Taqmanprotokoll bestimmt wie in Hampe et al. The Lancet, 2002, 359, 1661-1665 beschrieben.

Kontrollproben, die durch DNA-Sequenzierung überprüft wurden, wurden in jedem TaqMan Lauf miteinbezogen. Sonden wurden mit einem Reporter Farbstoff 6-FAM oder TET kovalent am 5' Ende und der Quencher Farbstoff TAMRA wurde am 3' Ende der Sonde gekoppelt. Die Primer und Sonden wurden von MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Folgende Primer und Sonden wurden verwendet:

Für NOD2-SNP8 Polymorphismus

Primer: 1) 5' TTCCTGGCAGGGCTGTTGTC 3' (vor)

2) 5' AGTGAAGTGCTTGCGGAGG 3' (rück)

Sonde: 1) 5' FAM-CCTGCTCCGGCGCCAGGC-TAMRA 3'

2) 5' TET-CCTGCTCTGGCGCCAGGC-TAMRA 3'

Für NOD2-SNP12 Polymorphismus

Primer: 1) 5' ACTCACTGACACTGTCTGTTGACTCT 3' (vor)

2) 5' AGCCACCTCAAGCTCTGGTG 3' (rück)

Sonde: 1) 5' FAM-TTTTCAGATTCTGGGCGCAACAGAGTGGGT-TAMRA 3'

2) 5' TET-TTCAGATTCTGGCGCAACAGAGTGGGT-TAMRA 3'

Für NOD2-SNP13 Polymorphismus

Primer: 1) 5' GTCCAATAACTGCATCACCTACCTAG 3' (vor)

2) 5' CTTACCAGACTTCCAGGATGGTGT 3' (rück)

Sonde: 1) 5' FAM-CCCTCCTGCAGGCCCTTGAAAT-TAMRA 3'

2) 5' TET-CCTCCTGCAGGCCCTTGAAA-TAMRA 3'

Der optimierte Reaktionsmix mit einem Endvolumen von 10 µl bestand aus Universal Master Mix (PE Applied Biosystems), 400 nM von jedem Primer (vor und rück, siehe oben), 250 nM von jeder fluorogenen Sonde (siehe oben) und die DNA-Matrize (20 ng/well). Alle Reaktionen wurden in einer 384-Lochplatte (Abgene, epsom, Uk) durchgeführt und mit Hilfe des Thermocyclers Primus-HT (MWG Biotech) amplifiziert. Die Konditionen für die PCR-Zyklen waren wie folgt: 50°C für 2 Minuten, dann 95°C für 10 Minuten gefolgt von 40 Zyklen von 95°C für 15 Sekunden (Schmelzschrift) und 60°C für 1 Minute. Nach dem PCR-Lauf wurde

die freigesetzte Fluoreszenz mit dem ABI PRISM® 7700 Sequenz-Detektionssystem (PE Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) gemessen.

Erhöhungen in der Menge an Reporterfarbstofffluoreszenz während der 40 Zyklen der Amplifikation wurden durch den Sequenz Detektor (SDS Version 1.6, PE Applied Biosystem) aufgezeichnet. Veränderungen in der Reporter Farbstofffluoreszenz des 6-FAM gegen Veränderung des Reporterfarbstoffs TET wurden graphisch ermittelt (homozygotes FAM gegen homozygotes TET gegen heterozygotes FAM/TET).

10

Klinische und statistische Analysen

Drei Hauptvariablen (TRM an 365 Tagen = 1 Jahr TRM, Gesamt-Grad von schweren GvHD (Grad III/IV) und Stadium von gastrointestinalen GvHD) wurden in Bezug auf NOD2/CARD15 Mutationen analysiert. Kumulative Inzidenz, die das konkurrierende Risiko des Todes von anderen Toxizitäten oder Rezidiven von GvHD reflektiert und Todesfälle von Rezidiven für TRM wurden für jeden dieser Parameter berechnet. Die Zeit zum klinischen Ereignis (TRM/GvHD) wurde ab Stichtag des SCT (Stammzelltransplantation) für Gesamt-GvHD und gastrointestinales GvHD gemessen. Die klinischen Ereignisse wurden bis Tag 100 und für 1 Jahr TRM bis Tag 365 nach SCT in das Modell miteinbezogen. Schrittweise multivariante COX-Regressionsmodelle wurden angepasst und testeten die unabhängige prognostische Relevanz von NOD2/CARD15 Mutationen. Die Grenze für reverse Selektionsprozeduren war die Fehlerwahrscheinlichkeit 0.2. Für den multivariaten Vergleich von Risikofaktoren für TRM und GvHD wurde nur das Alter der Patienten, Krankheitsstadium am Tage der Transplantation, Spendertyp (HLA-identische Geschwister versus URD versus RD) und NOD2/CARD15 Mutationsstatus betrachtet. Für die Analyse von NOD2/CARD15 SNPs wurde die weniger häufigen mit Crohn's Krankheit und einer eingeschränkten NF-kB Produktion assoziierten Hochrisikoallele als mutiert definiert wohingegen die häufiger beobachteten Allele als Wildtyp definiert wurden. Für die Analyse der Mutationen in Bezug auf das klinische Ereignis wurden die Gruppen gemäß 1) Auftreten von irgendwelchen Mutationen in Empfänger und Spendern und 2) in Bezug auf das Auftreten von irgendwelchen Mutation in Empfängern allein, Spender allein oder beide gebildet. Kumulatives Auftreten erlaubt die Einstellung auf konkurrierendes Risiko, das mit Hilfe NCSS Software (Version 2004), weitere statistische Analysen durch die Hilfe von der SPSS Software (Version 11.05) berechnet wurde.

Ergebnisse:

Frequenz der mutierten NOD2/CARD15 Allele:

5 NOD2/CARD15 Mutationen ereigneten sich mit einer Häufigkeit von 21,8% in Patienten und 13,7% in Spendern, die in dieser Studie einbezogen wurden. Eine homozygote Mutation wurde in nur einem Patienten und in seinem HLA-identischen Spender beobachtet, wohingegen alle anderen Patienten und Spender mit Mutationen heterozygot waren. Berechnete Haplotyphäufigkeit für
10 mutiertes NOD2-SNP8 war 0.056 für Empfänger (R) und 0.045 für Spender (D), für mutiertes NOD2-SNP12 0.021 (R) und 0.009 (D), und für mutiertes NOD2-SNP13 0.027 (R) und 0.034 (D). Deshalb waren die Haplotyphäufigkeiten nahe dem Bereich der Kontrollen. Dies resultierte in einem Gesamtprozentsatz von
15 SNPs (Wildtypgruppe) hatten. In 22 Paaren (13%) hatten nur die Empfänger mutierte SNPs (R mut), in 16 Paaren (9,5%) traten Mutationen nur in Spendern auf (D mut), wohingegen in 12 Paaren (7%) sowohl Spender als auch Empfänger Mutationen offenbarten (R & D mut). In unserer aufeinander folgende Kohorte von Patienten waren sowohl die Spender spezifischen Charakteristiken als auch
20 die Transplantat spezifische Prozeduren gleichmäßig zwischen Patienten/Spender Paaren mit und ohne Mutationen verteilt.

Klinisches Ereignis in Bezug zum Auftreten von NOD2/CARD15 Mutationen in Spender und Empfängern

25 Patienten wurden für ein Median von 16 Monaten verfolgt (Bereich 0,5 bis 59 Monate). Zuerst verglichen wir das Ereignis bei Patienten von Wildtyp Empfänger/Spender Paar (n=119) mit dem Ereignis bei Patienten in Paaren mit irgendwelchen Mutationen (n=50): Im allgemeinen war schweres GvHD Grad III/IV, schweres gastrointestinales GvHD und TRM nach 1 Jahr in Paaren mit
30 NOD2/CARD15 Mutationen verglichen mit der Wildtypgruppe signifikant erhöht (siehe Tabelle 1) Todesfälle von Rezidiven traten in beiden Gruppen auf: 18 in den 119 Patienten mit Wildtyp und 7 aus 50 Patienten in mutierten Paaren. Es gab ein erhöhtes Risiko von schweren Gesamt-GvHD in Transplantaten mit Spendermutationen, wenn die Mutationen gemäß dem Auftreten in Empfänger
35 oder Spender oder in beiden getrennt wurde. Zusätzlich gab es eine dramatische Erhöhung für die Gesamt- und gastrointestinale GvHD in den kleinen Subgruppen von Paaren mit Mutationen von Empfänger als auch Spendern. Wie in Tabelle 2 gezeigt, erhöhte sich das kumulative Auftreten von 1 Jahr TRM von 20% im

5 Wildtyp-Empfänger /Spender Paare auf 49% in Paaren die eine Empfängermutation ($p=0.003$), auf 59% in Paaren, die eine Spendermutation ($p=0.004$) und auf 83% in Paaren, die eine Empfänger und Spendermutation tragen ($p=0.001$). Nochmals, Todesfälle von Rezidiven waren fast gleichmäßig in diesen Subgruppen verteilt.

10 Die starke Assoziation von TRM mit NOD2/CARD15 Mutation wurde partiell durch ein erhöhtes Risiko nicht nur für den Tod durch GvHD aber auch durch respiratorisches Versagen in Folge diffuser primärer oder sekundärer pulmonarer Schäden erklärt: Wohingegen in der Wildtypgruppe nur 11/30 Todesfällen (37%) in Remissionen durch GvHD und respiratorisches Versagen verursacht wurde. Der Anteil erhöhte sich zu 17/26 (65%) in Paaren mit NOD2/CARD15 Mutationen.

15 Figur 1 und Tabelle 2 zeigen die kumulative Inzidenz (Kum. Inz.) von schwerer akuten GvHD (Grad III/OV) in Bezug zu NOD2/CARD15 SNPs. Im Vergleich zu Wildtyp (19%) erhöhte sich die kumulative Inzidenz auf 36% bzw. 44% im Falle von Mutationen entweder im Empfänger oder Spender und auf 58% im Falle von Mutationen in beiden (R & D mut).

20 **Relevanz der Beobachtungen für HLA-identische Geschwister gegenüber nicht-verwandten Spendertransplantaten und multivariante Analyse des Risikofaktors assoziiert mit TRM;**

25 Die Relevanz von Spendern und Empfänger-Mutationen wurden in den verschiedenen immunogenen in dieser Studie einbezogenen Subgruppen verglichen. Obwohl die Korrelation des Auftretens von TRM mit NOD2/CARD15 Mutationen deutlicher für die HLA-identischen Geschwistertransplantate war, gab es einen parallelen Trend für URD Transplantate (siehe Figur 2, Tabelle 3). In der URD Gruppe stieg das kumulative Auftreten der 1. Jahr TRM von 27% in Wildtyppaaren auf 55% in mutanten Paaren, wenn der Empfänger und Spender für HLA A, B, DRB1 und DQB1 glichen. TRM erhöhte sich von 29% auf 50 % in Paaren mit ein oder zwei DRB1 oder DQB1 Allel-Abweichungen.

35 Die kleine Gruppe von Transplantaten, die Antigenabweichungen aufzeigen, zeigte eine hohe Mortalität und erlaubte keine Beurteilung der Rolle von NOD2/CARD15 Mutationen in dieser besonderen Subgruppe. In der multivarianten Cox Regressionsanalyse waren Alter, Spendertyp und

NOD2/CARD15 Mutationen in Spendern alleine oder in Empfänger als auch in Spender unabhängige Risikofaktoren für TRM. Wie in Tabelle 4 gezeigt war das Zufallsverhältnis (hazard ratio) für TRM nach allogener SCT. betreffend NOD2/CARD15 Mutation 2.4 ($p = 0.02$; 95% CI [1.1;5.0]) für Empfänger-Mutationen, 2.5 ($p = 0.02$; 95% CI [1.2; 5.4]) für Spender-Mutationen und 6.0 ($p=0$; 95% CI [2.6;14.1]) im Fall der simultanen Mutationen von Spender und Empfänger. GvHD ($p = 0.006$) als auch NOD2/CARD15 Mutationen ($p=0$) blieben signifikante Risikofaktoren für TRM, wenn die allgemeine GvHD Grad IV als Risikofaktor für TRM in das Modell einbezogen wurde. Sogar wenn schwere GvHD Grad III/IV einbezogen wurde, blieb die Verteilung der NOD2/CARD15 Mutation signifikant, dass die starke und unabhängige Auswirkung der NOD2/CARD15 Mutation auf den Krankheitsverlauf (Befund) nach allogener SCT bestätigte.

Tabelle 1:

	Kumulative Inzidenz	95% KI Kum. Inz.	p	HR	95% KI HR
GvHD III/IV					
Wildtyp	19%	13% – 27%		1,0	
Mutante	44%	32% - 60%	0,001	2,7	1,5 – 4,9
GI GvHD					
Wildtyp	18%	12% - 27%		1,0	
Mutante	40%	28% - 56%	0,004	2,5	1,4 – 4,7
TRM 1 Jahr					
Wildtyp	20%	14% - 29%		1,0	
Mutante	58%	45% - 75%	0	2,8	1,7 – 4,9

Tabelle 1 zeigt die univariante Analyse der kumulativen Inzidenz der aktuellen GvHD Grad III/IV, gastrointestinales GvHD Stadium 2-4 und 1 Jahr TRM. Patienten/Spender-Paare mit nicht-mutiertem (Wildtype) NOD2/CARD15 ($n=119$) wurden gegenüber den Paaren mit Empfänger- oder Spender-Mutationen (mutated, $n=50$) verglichen. Cox-Regression wurde eingesetzt um die Gruppen zu vergleichen und Hazard Ratios zu analysieren.

Tabelle 2:

	Kumulative Inzidenz	95% KI Kum. Inz.	p	HR	95% KI HR
GvHD III/IV					
Wildtyp	19%	13% - 27%		1,0	
R pos	36%	21% - 61%	0,07	2,1	0,9 - 4,7
D pos	44%	25% - 76%	0,002	2,8	1,2 - 6,5
R & D pos	58%	36% - 94%	0,002	3,9	1,7 - 9,2
GI GvHD					
Wildtyp	18%	12% - 27%		1,0	
R pos	36%	21% - 63%	0,07	2,1	0,9 - 4,8
D pos	31%	15% - 65%	0,16	2,0	0,8 - 5,3
R & D pos	56%	36% - 94%	0,001	4,3	1,8 - 10,1
TRM 1 Jahr					
Wildtyp	20%	14% - 29%		1,0	
R pos	49%	31% - 76%	0,03	2,2	1,1 - 4,6
D pos	59%	38% - 91%	0,004	3,1	1,4 - 6,5
R & D pos	83%	65% - 100%	0,001	3,9	1,7 - 8,6

Tabelle 2 zeigt die detaillierte kumulative Inzidenz für GvHD Grad III/IV, gastrointestinales Stadium 2-4 und 1 Jahr TRM bezogen auf Spender und Empfänger NOD2/CARD15 Mutationen: Wildtype: nicht-mutierte Spender und Empfänger (n=119). R pos = Mutation nur in Empfängern (n=22), D pos = Mutationen nur in Spendern (n=16); R & D pos = Mutationen sowohl in Empfängern als auch in Spendern (n = 12). Cox-Regression wurde eingesetzt um die Gruppen zu vergleichen und Hazard Ratios zu analysieren.

Tabelle 3 zeigt die univariante Analyse der kumulativen Inzidenz von 1 Jahr TRM in Patienten/Spender Paaren mit Wildtyp NOD2/CARD15 gegenüber Paaren mit entweder Empfänger- (R pos) oder Spender-Mutationen (D pos) sowie Mutationen in beiden (R & D pos). Separate Analysen wurden für HLA-identische Geschwister Transplantation und URD Transplantate durchgeführt. bVergleich zwischen den Gruppen wurde mit der log rank Analyse durchgeführt. 95 CI confidence intervals.

Tabelle 3:

	Kumulative Inzidenz	95% KI Kum. Inz.	p	HR	95% KI HR
HLA-id. sibl.					
Wildtyp (55)	14%	18% – 42%		1,0	
R pos (9)	74%	49% - 100%	0,	7,9	2,6 – 24,0
D pos (6)	58%	27% - 100%	0,022	4,9	1,3 – 18,9
R & D pos (8)	75%	50% - 100%	0,004	6,4	1,8 – 23,0
URD					
Wildtyp (61)	28%	18% - 42%		1,0	
R pos (13)	36%	14% - 73%		1,1	0,4 – 3,3
D pos (9)	31%	13% - 100%		2,4	0,9 – 6,5
R & D pos (4)	56%	100%	0,01	4,2	1,4 – 12,5

Tabelle 4 zeigt die multivariante Risikofaktor-Analyse für 1 Jahr TRM. Relevante Patienten und Spender Prätransplantatcharakteristika wurden mit NOD2/CARD15 Mutation in Empfängern (R pos), Spendern (D pos) und beiden (R & D ps) verglichen.

Tabelle 4:

	N	Auftritt TRM 1Jahr	Risiko	95% CI	p
Alter					
bis 40 Jahre	58	15	1,0		
ab 40 Jahre	111	38	2,2	1,1 – 4,0	0,02
Stadium bei Tx					
früh	95	27	1,0		
fortgeschritten	74	26	1,3	0,7 – 2,2	
Donortyp					
HLA = sibl	78	20	1,0		
nicht verw.	87	29	1,7	0,9 – 3,2	
HLA df.rel.	4	4	10,7	3,4 – 33,3	0
NOD2/CARD15					
Wildtyp	119	26	1,0		
R pos	22	10	2,4	1,1 – 5,0	0,02
D pos	16	9	2,5	1,2 – 5,4	0,02
R & D pos	12	8	6,0	2,6 – 14,1	0,001

Patentansprüche

1. Verfahren zur Vorhersage und/oder Diagnose von mit mindestens einem der Polymorphismen 8, 12, 13 im NOD2/CARD15 Gen assoziierten Krankheiten durch Nachweis mindestens eines der Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13 im NOD2/CARD15 Gen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei es sich bei den mit mindestens einem Polymorphismus Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13 im NOD2/CARD15 Gen assoziierten Krankheiten um Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen, Graft-versus-host-Erkrankungen, Lungenerkrankungen, Monozyten- und/oder Makrophagen-abhängige Erkrankungen und/oder Leukämie handelt.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, umfassend die Schritte
 - a) Bereitstellung einer Probe enthaltend das Gen NOD2/CARD15 bzw. NOD2/CARD15-Nukleinsäuren,
 - b) Untersuchung des Gens NOD2/CARD15 auf das Vorliegen mindestens eines der Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 3, umfassend die Schritte
 - a) Bereitstellung einer Probe enthaltend das Gen NOD2/CARD15,
 - b) Isolation der DNA und/oder RNA aus der Probe,
 - c) Durchführung einer PCR mit für das Gen NOD2/CARD15 spezifischen Primern,
 - d) Untersuchung des Gens NOD2/CARD15 auf das Vorliegen mindestens eines der Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13.
5. Oligonucleotid bestehend aus mindestens 10 Nucleotiden, wobei das Oligonucleotid eine zum NOD2/CARD15 Gen komplementäre Sequenz hat und das komplementäre Nucleotid zur Mutation SNP8 und/oder SNP12 und/oder die Nucleotidinsertion SNP13 enthält.
6. Oligonucleotid gemäß Anspruch 5, wobei das Oligonucleotid des weiteren einen Detektionsmarker enthält.

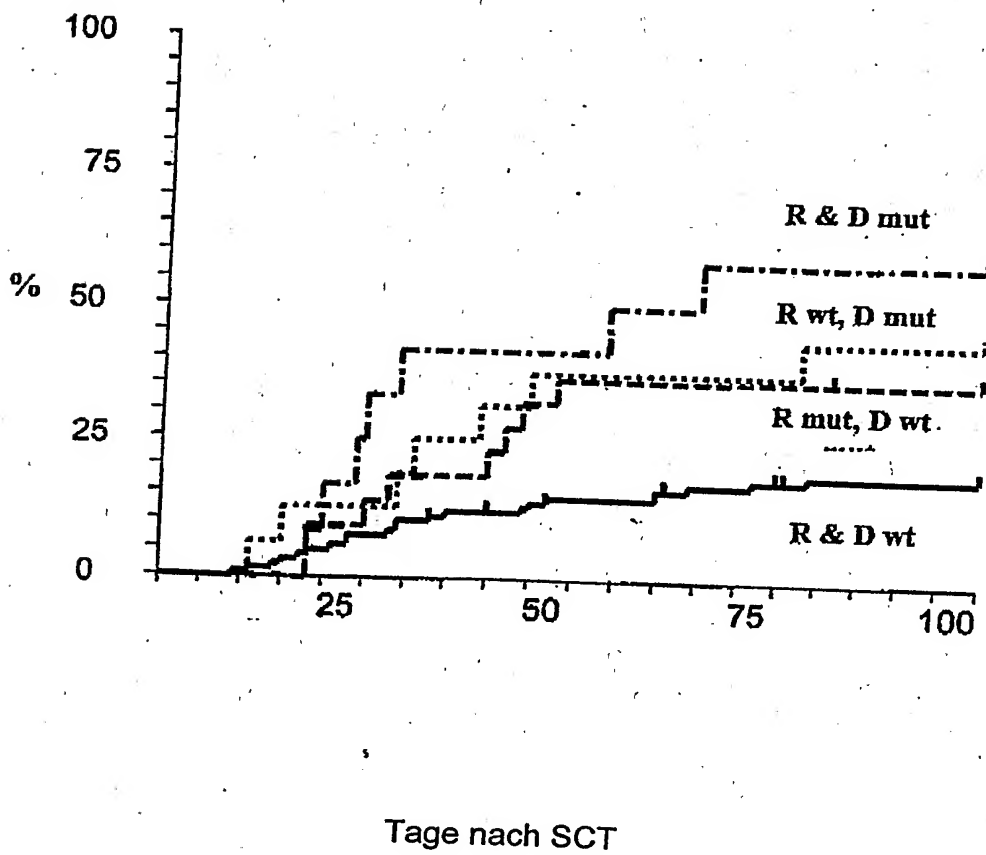
Zusammenfassung

- Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren sowie in diesen Verfahren verwendete Nucleotidsequenzen zur Vorhersage und/oder Diagnose von Krankheiten, welche
- 5 mit mindestens einem der Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13 im NOD2/CARD15 Gen in Verbindung stehen.

Figuren

Figur 1

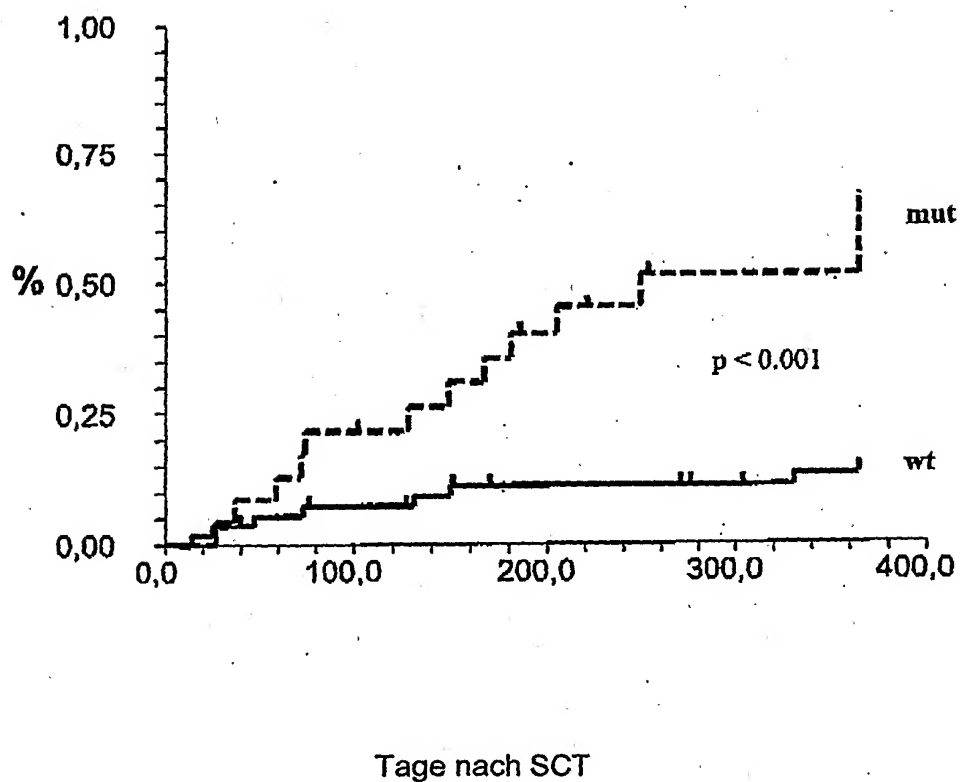
Kumulative Inzidenz
GvHD



Figur 2

Kumulative Inzidenz

1 Jahr TRM HLA-identische Geschwister



Figur 3

Kumulative Inzidenz

1 Jahr TRM URD

